

Best Available Copy

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-511982

(43) 公表日 平成11年(1999)10月19日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 1/12		G 0 1 N 1/12	B
1/28		33/553	
33/553		1/28	J
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 44 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平9-510974	(71) 出願人	メディカル・リサーチ・カウンスル イギリス国ロンドン・ダブリュ1エヌ・4 エーエル, パーク・クレセント・20
(86) (22) 出願日	平成8年(1996)9月5日	(71) 出願人	オニール, イアン・ケネス イギリス国ケンブリッジシャー・シービー 2・5 ジェイビー, グレイト・シェルフ ォード, レッド・ヒル・クロウス・5
(85) 翻訳文提出日	平成10年(1998)3月6日	(72) 発明者	オニール, イアン・ケネス イギリス国ケンブリッジシャー・シービー 3・9 エヌエフ, グランチェスター, ハ イ・ストリート・17
(86) 国際出願番号	P C T / G B 9 6 / 0 2 1 7 7	(74) 代理人	弁理士 酒井 一
(87) 国際公開番号	W O 9 7 / 0 9 6 0 0		
(87) 国際公開日	平成9年(1997)3月13日		
(31) 優先権主張番号	9 5 1 8 1 5 6 . 6		
(32) 優先日	1995年9月6日		
(33) 優先権主張国	イギリス (G B)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞を分離する方法

(57) 【要約】

本発明は、糞便から細胞を分離する方法において、a) 便をそのゲル氷点未満の温度に冷却する工程と、b) 便が実質上完全な状態に残るように、便をそのゲル氷点未満の温度に維持しながら便から細胞を採取する工程と、を含む方法を提供する。さらに本発明は、免疫磁気ビーズや硼酸の使用を含む、細胞を精製する方法を提供する。本発明にしたがって分離された細胞は組織の生物学または生化学的特性をモニターするための診断試験や分析手順に使用することができる。

【特許請求の範囲】

1. 糞便から細胞を分離する方法であって、
 - a) 便をそのゲル氷点未満の温度に冷却する工程と、
 - b) 便が実質的に完全な状態を残すように、便をそのゲル氷点未満の温度に維持しながら便から細胞を採取する工程と、を含むことを特徴とする方法。
2. 細胞を便の表面から採取する、請求の範囲第1項に記載の方法。
3. a) 便をそのゲル氷点未満の温度に冷却する工程と、
 - b) 便が実質的に完全な状態を残すように、便をそのゲル氷点未満の温度に維持しながら、水溶液で便の表面から細胞を洗い出す工程と、を含む請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。
4. 便を -10°C から 10°C までの温度に冷却する、上記請求の範囲のいずれかに記載の方法。
5. 便を 0°C から 5°C までの温度に冷却する、請求の範囲第4項記載の方法。
6. 便を短鎖脂肪酸またはその塩を含む水溶液で洗浄する、請求の範囲第3項乃至第5項のいずれか1項に記載の方法。
7. 便を酪酸ナトリウムを含む水溶液で洗浄する、請求の範囲第6項に記載の方法。
8. 削り取る、軽く塗布する、ブラシをかける、吸い取る、

あるいはその他の物理的な剥離作業によって便の表層から細胞を採取する、請求の範囲第2項に記載の方法。
9. 便の表層1.0mm未満を採取する請求の範囲第8項に記載の方法。
10. c) 予めに獲得した細胞の水性懸濁液を、細胞に選択的に結合することのできる抗体が結合している磁気ビーズを含む免疫磁気ビーズと混合する工程と、
 - d) 細胞が結合している磁気ビーズを磁氣的に回収する工程と、をさらに含む前記請求の範囲のいずれかに記載の方法。
11. a) 身体の廃物又は消化管液のサンプルを、選択的に細胞に結合することのできる抗体が結合している磁気ビーズを含む免疫磁気ビーズと混合する工程と

b) 細胞が結合している磁気ビーズを磁氣的に回収する工程と、
を含むことを特徴とする哺乳類の身体の廃物や消化管液から細胞を分離する
方法。

12. 抗体が、上皮細胞に結合できる B e r - E P 4 抗体を含む請求の範囲第10項または第11項に記載の方法。

13. 細胞が人間のものである、前記請求の範囲のいずれかに記載の方法。

14. 細胞が剥落上皮細胞を含む前記請求の範囲のいずれかに記載の方法。

15. a) 請求の範囲第1項から第14項のいずれか一項に記載の方法により、
糞便から細胞を分離する工程と、

b) D N A を細胞から抽出する工程と、

を含むことを特徴とする糞便から D N A を分離する方法。

16. 請求の範囲第15項に記載の方法に従って、被験者から採取した糞便から
分離可能な D N A の量を決定する工程を含むことを特徴とする被験者の結腸直腸
の腫瘍に対する診断試験。

17. 請求の範囲第1項乃至第14項のいずれかに記載の方法によって剥落上皮
細胞を分離し、その細胞を酵素活性について分析するか、あるいは R N A を分離
し、遺伝子発現について分析する工程を含むことを特徴とする上皮細胞の酵素活
性または遺伝子発現を評価する方法。

18. a) 請求の範囲第1項乃至第14項のいずれか一項に記載の方法に従って
上皮細胞を分離する工程と、 b) 分離した上皮細胞を生物学的または生化学的特
性について分析する工程を含むことを特徴とする、非侵入的な上皮組織の生物学
的または生化学的特性のモニター方法。

【発明の詳細な説明】

細胞を分離する方法

本発明は、細胞特に剥落した上皮細胞を分離する方法に関する。

剥落した上皮細胞は、DNA、RNA、及び蛋白質などの細胞の構成要素から成り、結腸直腸がん、ポリープ、潰瘍性大腸炎によって例示されるような上皮細胞の不健康な状態を確認、モニターするための数え切れないほどの手がかりを、潜在的に提供している。このような細胞が容易に発見できれば、例えばDNA変異、遺伝子発現、酵素活性などの定性分析及び／又は定量分析に対して多種多様な試験手順が適用できるようになる。

腫瘍化や悪性度を表す細胞、遺伝子、その他のバイオマーカを早期発見することは、がんやその他の病状の予防や治療において決定的な要素である。結腸直腸、肺、口腔、膵臓、胆管、膀胱およびその他のいくつかの上皮組織のがんを含む様々ながんがかなりの発生率で起きており(Cancer Incidence in Five Continents(五大陸におけるがんの発生率)第VI巻 パーキン D. M. 他著、IARCサイエンティフィック・パブリケーションズ、No. 20、IARC リヨン、フランス)、多くの場合、非侵入的で、費用がかからず、一般的に使用できるスクリーニング方法がないため、腫瘍の診断が遅すぎて治療ができなくなるため、かなりの死亡率を呈し

ている。現在、多くのがんのケースは、腫瘍の塊、出血またはその他の不調により診断手順を受ける結果となって初めて検出され、その診断手順では、成功する見込みの低いこともしばしばである。荒治療を必要とする、かなり進んだ段階の腫瘍形成を確認できるのだけなのである。この問題の例証となるのは、初期症状は、より一般的な病気の症状と混同しやすいが、最終的にがんの診断が下された時には、平均余命は三ヶ月しかないといわれる膵臓がんである。また、もう一つの例証となるのは、人口の5%を苦しめ、3%を死に至らしめるが、研究によると早いうちに介入すれば治療可能であると言われている結腸直腸がんである。がんに関連する遺伝変化を検出する最近の方法(マオ L. 他 Cancer Research(がんの研究)(増刊)、54、1939s-1940s(1990))や、腫瘍形成

につながる遺伝病巣の因果的連鎖についての初期知識（フィーロン E. R. 他、Cell(細胞)、67 757-767）が進歩の望みを与えてくれているが、進行する前、あるいは悪性腫瘍になる前の段階で腫瘍形成を非常に早く発見できる手順がないということは明らかである。

がん前状態及びがん状態を初期に発見し、治療するための大量スクリーニング・プログラムの提供において重要なかぎとなるのは、診断分析を実行できる組織、細胞またはDNAサンプルを得る単純な手順の必要性である。がん又はポリープ又は腫瘍形成前の病巣が検出された個体、又は遺伝的素質によりあきらかに危険が高まっている個体に関しては、治療に対する応答や再発の証拠を発見するために、機会ある毎に

継続的に組織を採取することも重要である。そのような治療には、腫瘍を除いたり、防御的な代謝変化を誘発するように設計されたものも含まれる。

従来のサンプリング手順では、通常患者からの組織生検を伴う。しかし、生検手順は、侵襲的であり、局部または全身麻酔を必要とすることがしばしばであり、患者に対しては少なくともかなりの辛苦を与える。さらに、腫瘍やポリープのサンプリングを除き、生検は、器官や組織全体の中から生来非代表的な組織の小さいサンプルを採取する。従ってこのような技術はルーチンの大量スクリーニングには不適當である。

結腸直腸腫瘍の早期発見へのスクリーニング・アプローチは、糞便の潜血試験（FOBT）に基づいている。FOBTの主な利点は、非侵襲的であること、単純なこと、そしてコストがかからないということである。しかし、便の中に血液が存在するかしないかが必ずしも腫瘍の有無に関係するとは限らない。その結果、この方法は、誤って陽性の結果を出さないとも限らず、がんや特にポリープを検出できないこともしばしばある。

数種類の研究は、結腸細胞の増殖の増加と結腸直腸がんの危険性及び／又は結腸直腸腫瘍の存在との間の相関関係が存在しうることを示している。（Terpstra O. T. 他、Gastroenterology（消化器病学）、92、704-708（1987）；スカルマチ A. 他、Cancer Res.（がんの研究）、50、7937-

7941 (1990) ; リシオ M. 他、Cancer Res. (がんの研究)、51、(1991) ; アルシェ

ンバ I. F. 他、Cancer(がん)、71、1954-1959(1993))。しかし、これらの結果は、統計的有意性に到達できないこともしばしばであり、何人かの患者に対しては反対の結果も出た。現在まで公表された証拠や方法では、信頼できるあるいは実用的な診断試験の根拠の提供として、結腸直腸がんの危険及び／又は結腸直腸腫瘍の存在に対する結腸細胞の増殖の増加を実証することができていない。

人間の細胞を均質化した便から分離するための方法が報告されている(アルボー G. P. 他、Int. J. Cancer(がん)、52、347-350 (1992) ; イエンガー V. 他、FASES (糞便) J.、5、2856-2859))。報告された方法では、均質化した便のサンプルを使用しているが、ルーチンの大量スクリーニングに使用するには反復が困難であることが分かり、さらに迅速性、収率、そして選択性に欠けている。デュッタ S. K. 他 (AGA Abstracts, Gastroenterology (要約、消化器病学) 108, (1995)A463は、結腸直腸がん患者及び対照被験者からの均質化された便のサンプルのグラム当たりの、回収された結腸細胞の数を比較する試みにおいて、密度勾配分離に基づいたこの方法を採用した。結果、がん患者の方に、より多くの細胞が回収される傾向が見られたが(対照患者の約二倍)、その差は統計的な有意性には至らなかった。

血液から転移性の悪性上皮細胞を分離させる方法も報告されている(ハーディング他、Cancer Research(がんの研究)、53, 3455-3458(1993))。この方法で

は、細胞を分離するために、上皮細胞に特異的なモノクローナル抗体でラベルされた免疫磁気ビーズを採用しており、それは、PCRを使ってK-ras腫瘍マーカー遺伝子中の点突然変異の存在について分析された。しかし、免疫磁気ビーズの直接使用は、免疫磁気ビーズと身体の廃物や胃腸管液にある材料との間の非特異的結合の相互作用がありえるという観点から、身体の廃物や胃腸管液からの

上皮細胞の分離への一般的な適用性は期待しえない。

がんに伴随する遺伝子の変化を検出するために、少量の均質化した冷凍便を細胞融解水溶液で希釈し、その結果得られた懸濁液を遠心分離し、ガラスの粉で浄化することによってDNAを人間の便から直接抽出する方法も報告されている(シドランスキー D. 他、Science (科学) 256、102-105(1992))。ロクティノフおよびオニール(Int. J. Oncology(腫瘍学)、6、437-445(1995))は、細胞融解緩衝液でラットの糞をインキュベートし、その後、フェノールクロロホルム抽出プロセスを行なって、その糞からDNAを分離する方法を報告している。しかし、これらの両方法では、PCR増幅するための純粋なDNAはほんの限られた量しか得ることができなかった。

従って、(a)非侵入的又は最小限の侵入で、(b)完全な状態の細胞を回収できるように迅速で、(c)複数回の分析に適した十分な量の細胞を提供し、(d)分析においてサンプルを希釈したり干渉する可能性のある無関係な材料を排除できるように選択的で、(e)代表的な細胞の収集を提供で

きる、細胞サンプリング方法の必要性が残る。多くの分析法の基礎となるさらなる要件は、対象となっている細胞の中にあるDNAや他の細胞構成要素を単に回収することではなく、実際の細胞を得ることである。

本発明によれば、糞便から細胞を分離する方法であって、便をそのゲル氷点未満の温度に冷却し、便が、実質的に完全な状態を残すように、便をそのゲル氷点未満の温度に維持しながら、その便から細胞を採取する工程を含む方法が提供される。

本発明は、便の表面からの細胞の採取への特定の適用を伴い、あらゆる動物(例えば人間)の便から採取した哺乳類細胞の分離に適用できる。人間は、一般的に齧歯動物のような他の動物のペレット状の便に比べて柔らかい便を産する。便をゲル氷点以下の温度に冷却することにより、便の構造が安定し、その結果、特に便の表面から人間の細胞を選択的に採取することが可能になることが判明している。ゲル氷点において又はゲル氷点未満では、便は、柔らかい状態からその形状を維持する比較的固い材料へと変わり、操作しやすくなる。ゲル形成の正確な

温度は、便によって異なり、食餌などの要素に影響される。便の形状は、デガンおよびフィリップス(Gut(内臓)、(1996)、39、109—113)によって、階級7(水状、固形物なし)から1(分離状態、固い塊)までに分けて特徴づけられている。便をそのゲル氷点未満まで冷却すると、便の形状を通常の範囲である6(ふわふわした小片、整っていない縁、“かゆ”状)と2(ソーセージのよ

うな形状で塊状)との間の状態から1(分離状態、固い塊)に変える効果がある。

便は、その便から細胞を採取している間は、ずっとゲル氷点未満に維持されているのが好ましい。また、完全な形の便の表層からは、特に豊富な上皮細胞が提供されることが判明している。

本発明によれば、インビボな細胞を直接表わし、がんに関連する現象の定量および定性分析の両方を実行できる、上皮細胞の個体群を分離する方法が提供される。広範囲にわたるがんに関連する現象が、原則として、悪性形質転換の複数の工程を経験した組織と、それを構成している細胞および細胞の構成要素において発生するということが知られており、本発明によれば、これらの細胞や副次細胞構成要素への非侵襲的アクセスが提供され、それによってがんの発見、治療および予防に重要な多くの現象のモニターが可能になる。

好ましくは、本発明は、便の表面からの細胞の採取を含む。便の表層は、分離に適した、特に豊富な上皮細胞の供給源を提供する。典型的には、6分の1から3分の1の間の結腸の上皮細胞が、毎日剥落する。本発明の権利を損なわずに、これらの剥落細胞のうちのいくつかは、便の周りに、低い割合でバクテリアの細胞と他の糞便の物質を含む「鞘」を形成しているとみなすことができると考えられる。さらに、便の表層における細胞の生存能力は、i)細胞が集積してブラークになる傾向、ii)便の表面における酸素の入手可能性、およびiii)マイクロフローラル発酵によって局所的に高い濃度で

形成された酪酸塩(butyrate)を燃料として使用することのできるその独自の能力

によって促進されると考えられる。酪酸塩の酸化は、剥落の後、血液が運ぶ栄養がない細胞に対して燃料を提供すると考えられる。細胞を便の表層から分離させるという方法は、均質化された便からの細胞の分離に比べて、収率、純度そして回収の容易さにおいてかなりの利点を提供することが判明している。

ここで使用されている「表層」という用語は、糞便材料の層で、便の表面の1.0 mm以内、好ましくは0.25 mmまでのものをいう。

本発明の方法は、すべての動物、好ましくは哺乳類、さらに好ましくは人間の便に適用することができる。

細胞は、冷却およびゲル化された便から、削り取る（例えば、ナイフや外科用メスを使用）、軽く塗付する（例えば、ガラスのスライドを使用して組織学分析用の「スメア（smear）」を設ける）、ブラシをかける、吸い取る又は他の物理的な剥離作業によって、あるいは洗浄によって選択的に採取することができる。好ましくは、細胞は、実質的に完全な便の構造を維持しながら選択的に便から採取する。また、好ましくは、細胞は、洗浄によって便から採取する。

本発明の特徴は、剥落細胞が；

- a) 便をそのゲル氷点未満の温度に冷却する工程と
- b) 便が実質的に完全な状態を残すように、便をそのゲル氷点未満の温度に維持しながら水溶液で便の表面から細胞を洗い出す工程

を含む方法によって、便から分離できるという点である。

そのゲル氷点より高い温度の便を少量の水溶液で洗い出すと、水は、すばやく便に吸収され、洗液を得ることができないことが判明している。また、過剰量の水溶液を追加すると、便は、水を吸収し、便の材料のスラリーや懸濁液を形成する。このようなスラリーや懸濁液から剥落細胞を分離するのは、非実用的な方法であることが証明されている。何故なら、便の中にある大量の粘液、バクテリア、および食べ物のかすなどの材料の中から細胞を分離するのは困難だからである。

本発明において、便をそのゲル氷点未満の温度に冷却する工程は、便の構造を安定させる効果がある。好ましくは、便は、 -80°C から 15°C 、好ましくは、

-10℃から15℃、好ましくは-10℃から10℃、さらに好ましくは0℃から5℃の温度に冷却する。便をそのゲル氷点未満の温度に維持するために、便は、ゲル氷点未満の温度にあらかじめ冷却しておいた水溶液で洗浄することができる。好ましくは、水溶液は、氷温のものがよい。便は、細胞の分離の前に実質上ゲル氷点未満(例えば-20℃から-80℃)に冷却して保存することができる。また、ゲル氷点未満の温度を保つため、洗浄中に便と水溶液に外的冷却を適用することができる。冷却した便を水溶液で洗浄すると、水の顕著な吸収がおこらない(一般的には10%)ということが判明している。さらに、例えば静かに注ぐこと(decanting)、濾過によって水溶液の洗液を便から分けると、その洗液には高い濃度の剥落細胞が含まれ、便の中に存在するバクテリアや食物のかすな

どによる汚染がかなり減る。

便は、水溶液で一度以上洗浄し、洗液を合わせてもよい。また、洗浄手順として静かに攪拌してもよい。便が分散したり剥落細胞に富んだ表層が過度に侵食されるのを避けるため、過度の洗浄及び／又は攪拌は避けるべきである。便は、洗浄手順の間は実質的に完全な状態を保つのが好ましい。典型的には、本発明の手順によって得た洗液は淡い黄色を呈している。明らかに茶色い洗液の着色及び／又は固体の粒子の洗液中における可視的な存在は、サンプルの過度の洗浄や攪拌により、粘液、バクテリア、あるいは食物のかすなどの材料による顕著な汚染が存在していることを表している。本発明の方法は、洗液に茶色の着色が観察されないような静かな攪拌による便の洗浄を含むのが好ましい。

好ましくは、便は、短鎖脂肪酸またはその塩、好ましくはC₁₋₆脂肪酸またはその塩、好ましくは、酪酸の塩、さらに好ましくは酪酸ナトリウムを含む水溶液で洗浄する。このような水溶液で洗浄することにより、剥落細胞の回収が改善されることが判明している。

好ましくは、便は、細胞培養媒体に基づいた水性懸濁溶液、好ましくはイーグルの最少必須培地MEMのような等張媒体で洗浄する。好ましくは、水溶液は、さらに、以下の構成要素の1つ以上を含む：N-アセチルシステインのようなム

コ多糖類加水分解酵素の試剤；ペニシリン、ストレプトマイシン、アムホテリシンB、ゲンタマイシンのような抗生物質；炭酸水素ナトリウムのような無機塩；EDTA及び／又はヘパリ

ンのような便に血液がある場合に血液凝固を防ぐためのキレート化剤；細胞塊の分散を助けると考えられている熱ショックウシ血清アルブミン等の蛋白質。

上記の水性洗浄技術は、多くの分析や診断の目的に適した純度の懸濁液の中に剥落細胞のサンプルを提供する。しかしながら、それでも懸濁液は、典型的には粘液、バクテリアおよび食物のかすなどの材料で汚染されている。細胞の懸濁液は、次の技術のうちの一つ以上を使ってさらに精製することができる。

a) 細胞懸濁液は、比較的ゆっくりの速度（例えば、250 g）で遠心分離することができる。このような遠心分離により、所望の剥落細胞を優位に含むペレットが得られる。バクテリアの細胞と粘液は上澄液に優位に含まれ、ペレットから静かに注ぎ出すことができる。ペレットは所望であれば懸濁溶液の中に再懸濁させてもよい。

b) 細胞懸濁液は、過剰量の硼酸によって処理することができる。好ましくは、懸濁液は、粉末状の硼酸で処理し、一部が溶解しないで残るように十分使用する。細胞と硼酸の懸濁液は、硼酸が沈殿する前に数分間かき混ぜるか、振り混ぜる。過剰量の硼酸は、上澄液を静かに注ぐか濾過することによって取り出すことができる。硼酸による処理は、細胞懸濁液内の粘液を分散させて除去するのに有利であることがわかった。

c) 細胞懸濁液は、調査したい細胞に選択的に結合させることのできる抗体が結びついている磁気ビーズを含む免疫磁気

ビーズで処理し、その後、細胞が結合している磁気ビーズを磁氣的に回収することができる。不純物は、水性懸濁液の中に残る。細胞の回収を最大限にするため、過剰量の免疫磁気ビーズを使うのが好ましい。

工程(b)や(c)は、便を洗浄することによって得た細胞の水性懸濁液に硼酸及び／又は免疫磁性ビーズをそれぞれ追加することによって実行しうることが

認識される。また、便を洗浄するのに使用する水溶液は、過剰量の硼酸及び／又は免疫磁気粒子を含んでいるものでもよい。

工程(a)、(b)、(c)は、それぞれ任意に行うことができ、例えば便が洗浄中に実質的に完全な状態に残り、残留粘液がその後の分析手順を妨げない場合は省略することもできる。

本発明によれば、細胞の水性懸濁液と粘液の硼酸による処理を含む、剥落細胞を粘液から分離させる方法が提供される。好ましくは、過剰量の硼酸を使用する。ここで使用している「過剰量の硼酸」とは、硼酸の一部が溶解されずに残るだけの十分な量を意味する。

本発明によれば、

- a) 身体の廃物や消化管液のサンプルを、細胞に選択的に結合することのできる抗体が結合されている磁気ビーズを含む免疫磁気ビーズと混合する工程と；
- b) 細胞が結合している磁気ビーズを磁氣的に回収する工程を含む、哺乳類の身体の廃物や消化管液から細胞を分離させる方法が提供される。

予想に反して、哺乳類の細胞は免疫磁気ビーズを使って哺乳類の廃物や消化管液から分離させることができるということが判明している。特定のタイプの細胞に特異的に結合できる抗体を使用すると、例えば、抗原マーカを有する腫瘍細胞等の上皮細胞、リンパ球またはマクロファージまたは異常細胞など、特定のタイプの細胞の分離を容易に行なうことができる。好ましくは、細胞の回収を最大限にするため、過剰量の免疫磁気ビーズを使用する。

免疫磁気ビーズを調製する方法については、ハーディング他(Cancer Research(がんの研究)、53、3455-3458(1993))に記載されている。適当な磁気ビーズがダイナル社(ノルウェイ、オスロ)から市販されている。ビーズには、調査したい細胞に結合させることができる抗体を塗布してもよい。例えば、上皮細胞は、抗体Ber-E P 4(ダコ(デンマーク、ゲストロープ)から市販されている)のような、上皮細胞を結合することのできる抗体で覆われたビーズを使用して分離することができる。リンパ球とマクロファージは、CD 8に特異的な抗体を使って分離することができる。マクロファージは、CD 1

4に特異的な抗体を使って分離することができる。その他の型の細胞については、標的細胞に特異的な適当な抗体を使って分離することができる。

抗体は、直接（例えば共有結合で）あるいは間接的（例えば、他の抗体を介して）にビーズに結合させることができる。間接結合の例が、ハーディングム他（同書）で説明されており、それによると、ヒツジ抗マウスIgGで共有結合で被覆

された磁気ビーズ（ダイナビーズ M-450）が、Ber-EP4とインキュベートされている。

免疫磁気ビーズの使用は、すべての哺乳類の身体の廃物または消化管液からの細胞の分離に適用できる。ここで使用している「消化管液」という用語は、唾液、胆汁、膵臓、十二指腸、腸の液を含む、動物の消化管から出るすべての液体を表している。また、「身体の廃物」とは、糞便、尿、痰を含む、動物の身体のすべての廃物を意味する。例えば、糞便は、腸管、特に結腸直腸からの細胞の入手源として使用することができ、尿は膀胱や前立腺の細胞の入手源として、唾液または痰は口内の粘膜、気管、気管支および肺細胞の、そして膵臓液、胆汁または十二指腸液は膵臓および胆管の細胞の入手源として使用することができる。好ましくは、尿、十二指腸液や糞便、より好ましくは、糞便を本発明の方法に採用する。

使用するビーズの数は、目的によって選択する。例えば、サンプルが限られた数の細胞しか含まない場合（例えば尿において）に、また、細胞に対するビーズの比率を高くすることにより（便の表面からのDNA定量分析のように）臨床的に測定したい細胞量の範囲において、最大限の細胞の回収が保証される場合において、定量分析の目的で、過剰量のビーズを使用し、上皮細胞の回収を最大限にする。 3×10^7 個という固定したビーズの数が、ほとんどの場合に適用できるということが判明した。

本発明の技術は、前述のように、あらゆるタイプの細胞の分離に使用することができる。そのような細胞には、上皮細

胞、リンパ球、マクロファージが含まれる。細胞は、上皮細胞を含むのが好ましい。上皮組織は、一般的に人間の身体で最もがんの危険性が高いところである。これは恐らく (a) 食餌及び／又はたばこ及び／又は性的習慣及び／又は職業上の曝露の結果として、遺伝子毒性に曝露される結果となる上皮細胞のバリア機能と、(b)いくつかのDNAの損傷を、細胞周期制御DNAの修復とアポトーシスのメカニズムを徹底的に乱す突然変異に変換する働きもする高い増殖速度によるものである。ここで使用する「上皮細胞」は、上皮に広く保護されており、それ自身が腫瘍形成を経験する、あるいは潜在的に上皮において腫瘍を形成する結果に結びつきうる不利益な状態が存在していることを明らかにするために使用できる他の細胞のタイプを含む。

本発明のさらなる特徴によれば、前がん、あるいはがん状態を診断またはモニターするための試験または分析における、本発明の方法によって得た細胞のサンプルの使用が提供される。従来の組織学的あるいは免疫学的な分析、試験または診断技術はいずれも細胞のサンプルに適用することができる。本発明の、さらなる特徴によれば、前がん、あるいはがん状態を診断またはモニターするための試験や分析において使用するためのDNAの入手源としての、本発明の方法に従って得た細胞のサンプルの使用が提供される。

本発明のさらなる特徴によれば、糞便からDNAを分離する方法であって、

a) 細胞を本発明に従った方法によって糞便から分離する工

程と、

b) 細胞からDNAを抽出する工程

を含む方法が提供される。

便から分離した剥落細胞から抽出できるDNAの量、特に分離されたDNAの重量を便の重量で割ったものとして定義された「便のDNA指数」は、便を取った被験者が結腸直腸の腫瘍形成（がん性または前がん性）の状態にあるかどうかを表す指標となるということが判明した。

このように、本発明のさらなる特徴によれば、被験者から得た糞便から分離可能なDNAの量を決定する工程を含む、被験者の結腸直腸の腫瘍形成に関する診

断試験を行なうことができる。本発明の診断試験は、*in vitro*で行われる。

DNAは本発明に従った方法によって糞便から分離された剥落細胞から抽出することができる。

分離されたDNAの量、あるいはより好ましくは糞便のDNA指数を、直腸結腸の腫瘍形成(癌性あるいは前癌性の状態)が認められているか、あるいは健康であると思われる被験者の糞便から分離されたDNAの量、または便のDNA指数の値と比較することにより、その被験者が結腸直腸がんを有するか、結腸直腸がん前がん性状態にあるか、あるいは健康であるかが判別できる。

次に述べるDNAの分離および便のDNA指数の計算に関するプロトコールに従うと、健康な者の便では600未満の指数(一般的には55歳未満で100から250の間、55歳より上で200から600の間)が典型的に見られ、結腸直腸

がんを持つ被験者の便では1400を超える指数(通常1500から6000の間)が典型的に見られ、また、結腸直腸のポリープの腫瘍化において生物学上、中間に位置する結腸直腸のポリープを持つ人の便では、この指数について中間の値(健康な人とがんを持つ人との間)が見られた(ここでは、便のDNA指数は、分離したDNAのナノグラムの値を便の重さのグラムの値で割ったものである)。

結腸直腸の腫瘍を持つ被験者と、健康な人に対する便のDNA指数の間にはかなりの差があり、それが大きな内臓の腫瘍化の影響を受けている被験者を健康な被験者から区別するための診断試験の明らかな基礎を形成している。さらに、DNAを被験者から分離させる手順の非侵襲的性質が、この手順を大量スクリーニング・プログラムにとって魅力的なものにしている。患者の年齢が上がるに従って、便のDNA指数にも上昇傾向が見られる。しかし、これによって腫瘍を持つ人を識別する技術の能力が低下することはない。

癌腫に対するプロトコールの感受性と特異性は、典型的には両方とも0.90(90%)を超えることが示された。それとは逆に、慣用の糞便の潜血試験では、典型的に0.4から0.7の間の感受性と特異性を示している。本プロトコール

ルのさらにもう一つの利点は、その後の分析や確認試験に使用できるDNAサンプルが提供されるという点である。

その一般的な適用性から、本発明における細胞を分離する方法は、本発明に従ってがんや腫瘍形成の診断の過程において得た細胞を使用するだけに限られず、上皮組織を侵すその

他の不利益な過程の分析においても使用され、剥落細胞の検査により、診断、治療あるいは予防において使用するための情報を得ることができる。これらの状態には、潰瘍性の大腸炎、関連上皮の炎症状態、いくつかの上皮細胞のゲノムへのウイルスDNAの組み込みなどが含まれるが、これらだけに限らない。本発明によって得た細胞は、例えば、結腸直腸の上皮細胞で予防的な試剤によって計画的に誘発した代謝の変化などのような、有利な変化を評価するための分析にも使用することができる。細胞がバイオマーカの働きをする有利な変化には、増殖、段階Iの発がん物質活性化酵素活性、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼやNADPHキノン還元酵素のような防御酵素に対する変更が含まれるが、これらだけには限らない。

曝露バイオマーカは、がん病原学の確認と(発がん物質やマイトジェン、プロモータなどのような)、職業や生活様式の中にある活性構成要素に対する個人の現実の曝露の確認のために広く研究されている。剥落上皮細胞の容易な抽出により、頻繁には入手できない、あるいは辛うじて、またはほんの少量だけ入手可能な組織を得ることができる。調査された曝露のバイオマーカには、発がん分子の部分を含むDNA付加物、酸化的DNA損傷、DNAストランドの破損およびDNA修復酵素活性などが含まれる。付加物が豊富な可能性は非常に低いため、これらのバイオマーカの分析には、最も大きい、実用可能なDNAのサンプルを必要とするものもある。本発明はこの目的のために、剥落細胞を容易に分離する

方法を提供する。

発がん物質(段階I)を活性化させたり、あるいはその反応代謝物(段階II)を妨害する酵素の相対活性は、がんの予防と個々が受け継いだがんの素質の確認

にかなり関与している。齧歯動物における数多くの実験において、抗発がん物質による抗がん作用は、これらの活性、特に段階IIの酵素の活性に対する変更と深く関わっているという結果を示したので、これらの酵素の活性を分析するために上皮細胞を得ることが、直接の関心事なのである。典型的な例（ラオ他（1993, Cancer Res., (がんの研究), 53, 2502-2506）では、オルティプラッツ(oltilplaz)（キャベツのなかで自然に発生する化合物に関係する物質）により、F344ラットにおける、AOMが誘発する結腸直腸腫瘍の発生率が四分の一に減少している一方、切開によって取り除いた結腸の組織では次のような段階IIの酵素活性が2から6倍に増えているという結果を示している；（a）ハビック他（J Biol Chem（1974）249, 7130-7139）の方法で分析したすべてのグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（以後、GSTと呼ぶ）；（b）NADP(H)：ベンソン他（Proc Natl Acad Sci USA（1980）77, 5216-5220）の方法で分析されたキノ還元酵素（以後QRと略す）；（c）テンプル他（J Lab Clin Med（1971）77, 1015-1019）の方法によって分析されたUDP-グルクロニルトランスフェラーゼ。段階IIの酵素の多くは知られており、それらのほとんどは発がん物質を水溶性の分子と結び付ける

（例えば、GSTによるグルタチオン結合）働きをする。その他の特に重要で類似した効果を持つ酵素には、発がん物質を硫酸化またはアセチル化し、結腸直腸がんに関わるクラスの発がん物質をさらに活性化させるという望ましくない影響を及ぼすN-スルホトランスフェラーゼとN-アセチルトランスフェラーゼ（NAT）が含まれる。さらにもう一つの酵素のグループは、DNAの損傷を修復する。上皮組織におけるこれらの段階I、またはII、または修復の酵素活性の判定は、実用的な用途を持つがん研究の最も活動的な分野である。

段階IとIIの酵素は、遺伝学的に決定したレベルと環境的及び食餌的な曝露によって誘発されうるものに従って人間の組織の中で発現する。人間についての多くの研究において、あるタイプのGST酵素の不足は結腸直腸や他のがんの危険性の増加と関連しており、齧歯動物の結果が人間に当てはまると仮定した場合、

結腸の上皮において追加のGST活動を故意に誘発することにより、がんを予防しうる。同じように、段階Iの酵素の抑制も予防に役立つ。人間の剥落した結腸上皮細胞におけるGSTまたはQR活性の検出についてここで説明するが、これは、本発明におけるこれらの細胞を便から分離する方法により、容易に行なえるようになった。

本発明によれば、剥落した上皮細胞を本発明の方法により分離し、細胞を酵素活性について分析するか、あるいはRNAを分離して遺伝子発現について分析することを含む、上皮細胞の酵素の活性や遺伝子の発現を評価する方法が提供される。さらに本発明は、本発明の方法により上皮細胞を分離し、

分離した上皮細胞を生物学的または生化学的特性について分析する工程を含む、上皮組織の生物学的あるいは生化学的特質をモニターする、非侵入的方法を提供している。

個々の遺伝子型の決定は、遺伝学的素質を決定するのに、益々重要な仕事になってきており、剥落細胞からは、この目的のために十分なDNAを得ることができる。法医学で適用されるDNA指紋はこれをさらに応用したものである。

本発明により、発がん過程における、非常に早期の腫瘍形成前から進行した腫瘍化までのある一段階、あるいは複数の段階の前兆となる、遺伝子学上、形態学上、あるいはその他の異常の兆候を分析するのに適した剥落上皮細胞のような細胞のサンプルの提供を容易に行なうことができる。本発明は、よく知られた遺伝学的素質及び／又は危険性を増加させる物質への曝露などの理由から、がんへの発展の危険性が高い、明らかに健康な人の母集団のルーチンの大量スクリーニングを容易にするというだけでなく、侵入的な手順を実行せずに潜在的に暗示している兆候を研究するためのこれらの技術の使用も含む。例えば、数ヶ国においては、50歳以上の男子のような、結腸直腸のスクリーニングが勧められる、区別しうる副母集団があるが、その他の国では、従来の結腸検査のコストが高いために奨励されていない(ハートA. R. 他、Gut(内臓)、36、590-598(1995))。下に例示したその他の副母集団もまた、実質的に危険性が高く、初期のスクリーニングの利益を受けるべきである；

i) 遺伝学的GSTIのない者 - すべての部位 (アイドルJ.

R., *Mutat. Res.* (突然変異の研究)、247、259-266(1991))

ii) GSTIなし、および高速オキシデータ及び/又はアセチレーター結腸直腸の部位 (カドリュエバ F. F. 他、*Env. health persp.* (環境と健康の将来の展望)、98、69-74(1992))

iii) GSTIなし、および低速オキシデータ及び/又はアセチレーター膀胱部位 (ヘイン D.W., *Biochem. Biophys. Acta*(生化学、生物学 Acta)、948、37-66(1988))

iv) 喫煙者-肺、脾臓、膀胱 (US Dept. Health (米国厚生省) ヒューマン・サービス・パブリケーション No. 82-50179(1982))

v) 結腸直腸がん又はポリープを持つ近い親戚が一人以上いる者-結腸直腸部位 (宇都宮 J. 他、eds. *Hereditary Colorectal Cancer* (遺伝性の結腸直腸がん) 東京スプリング・バーラ格(1990))

vi) 胆嚢または脾臓がんを持つ親戚が一人以上いる者-胆嚢および脾臓部位 (フェルナンデス他、*Can. Epi. Biom. & Prev.*、3、209-212(1994))

vii) 芳香族アミンに職業上曝露される者-膀胱部位 チェルノゼンスキー I. N. 他 (*Environmental Carcinogens; Selected Method of Analysis*(周囲の発がん物質; 選択された分析法第4巻 IARC サイエンティフィック・パブリケーションズ 第40版 フィッシュベイ

ン他、IARC、リヨン、3-12(1981))

viii) 風媒の発がん物質、特に多環式芳香族炭化水素、ラドン、周囲のたばこの煙、料理用エールゾル、木の粉、ホルムアルデヒドに職業上曝露される者-肺および洞/鼻通路部位 (IARC *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol.* (人間の結腸に対する発がん物質の危険性の評価についての論文) 1-62 IARC、リヨン)

ix) 多くの性的交渉相手と接している、及び/又は性的交渉相手が以前多くの性

的交渉相手と接していた歴史がある女性—頸部の(cervical)上皮部位 (ボッシュ F. X. 他、Can. Epi. Biom. & Prev. 3、375—379 (1984))

ここに例示したような遺伝子学的素質と危険を高める環境への曝露のいずれかの組み合わせにより、個人は上皮組織のがんの進行の危険性がかなり高い状態に置かれ、それゆえ、35歳くらいの早い年齢から反復してスクリーニングを受ける必要があることを示している。

さらに、異形成、ポリープまたはがんの再発、あるいはこれら検出可能な現象がおきる前の、癌腫発生の早い段階の再発を防ぐために化学的予防手順 (ケロフ 他、Can. Epi. Biom. & Prev. 3、85—98 (1994)) が開発されたため、スクリーニングは、どの化学予防剤が個体にとって最も効果的かを選択する際に必須の臨床ガイダンスの基礎を提供する (Szarka et al., in Current Problems in Cancer Ed. R. Ozols 13-16 Mosby-Year Book Inc.)。また、本発明の工程を採用し

ているスクリーニングは、予防的措置が有効な状態にあるかどうかをチェックするための、非侵襲的なその後のルーチンのモニターの基礎を提供する。そのようなスクリーニングにおいて特に重要な事は、細胞を、酵素の活性、細胞の数および形態学上の特性について分析することであり、これらはすべて、本発明で提供するような完全な状態の細胞を必要とする。

さらに、がんの危険性の増加についてのより多くの遺伝子学的素質や生活様式／家族／職業による危険要素が見つかったため、そのような素質／要素の組み合わせを持っており、従って非常に危険性の高い状態にある現在自覚症状のない、より多くの個人が識別されている。本発明の方法は特にそのような患者が必要とする、診断分析と試験およびそのような状態のルーチンのモニターを容易にするために適用される。

本発明の特別な利点は、本発明の工程により収集および分離すると、自然に剥落した細胞は、発がんの兆候を識別するための数種類の分析をまかなえるだけの十分な細胞を提供するのに十分に豊富であるという点である。例えば、K-ras または H-ras (ボーソン J. L., Cancer Res. (がんの研究)、49、

4682-4689(1989)) またはAPC (パウエル S. M. 他、Nature (自然)、359、235-237(1992)) またはp53 (グリーンブラット 他、Cancer Res. (がんの研究)、54、4855-4878(1994)) などの、例えば複製連鎖反応 (PCR) を基礎とする、腫瘍化に関連するがん遺伝子における突然変異の分析

などのような、発がんの初期段階の検出方法の最近の利用可能性 (ミュリス K. 他 eds. The polymerase chain reaction (複製連鎖反応)、パークハウザー、ボストン) は、本発明の細胞分離工程を、都合の良い時間に、生検法を使わずにこれらの細胞の異常性を検査する基礎としている。本発明によって分離した剥落細胞は、原則的にあらゆるタイプのPCRベースの分析に使用できる。また、本発明によって分離した剥落細胞は、細胞が従来入手できなかった、あるいはそのような分析で使用できるようなきれいな状態で入手できない形態学上の分析のための現存の方法に供することもできる。

これに関連する第二の利点は、全上皮表面からの剥落は、(腫瘍の位置が分っている場合を除き) もともと非代表的な組織のサンプルである生検よりもよいサンプルを提供することである。本発明の工程は、組織表面に位置していた剥落細胞の回収に関するものであり、次の考察は、これが全上皮組織の代表を提供することを表している。

i) 組織の表面の上皮細胞に豊富に存在するDNA付加物、すなわち、接近が容易な細胞は、深い位置に存在する非表面細胞を取り除くために生検で使用されていた同じ組織のものに量的に類似しており、あるいはそれより多く、質的には同じである (ストーン J. G. 他、Cancer Res. (がんの研究)、55、1267-1270(1995)) ;

ii) 上皮増殖や成長の正常の生物学的工程はより深い位置に存在する細胞をその後しばらく経って表面に到着するよ

う導き、それらの細胞の永久DNAや他の病変は、表面に循環して剥落し、下部組織の状態を表す。腔の中の物質の動作によって以前に形成されたような一時的

な病変は表面の細胞のみに影響を与え、それらの細胞は短期間に剥落するという理由から、長期にわたる影響はないが、DNA修復の自然の工程(ハナワルト P. C. 他、Mutat. Res.(突然変異の研究)、247、203-211(1991))、アポプトシス(ホフマン B. 他、Oncogene(がん遺伝子)、9、1807-1802(1994))は、遺伝子毒性作用のほんの少しの部分を除き、すべてが継続的に存在するのを最低限に抑える働きをする。アポプトシスによって除去できなかった突然変異細胞の生成は、細胞分裂中の幹細胞の分裂か組織表面により近い、より後の段階における分裂中の突然変異のいずれかによって発現する可能性があるが、この2つの起源は、細胞が生検によって得たものであるかまたは剥落によって得たものであるかによる遺伝学的分析についての違いは何も示さない。

従って、本発明にしたがって分離した剥落表面細胞の分析には、実際にすでに確立されているような長期間に渡る影響と、長期間にわたる影響につながる可能性のある短期間の影響を明らかにする組織の検査が含まれる。従って、剥落した細胞に集中することによって、この工程は危険な状態にある組織全体の重要な特徴を生来的に反映し、科学的に代表を表すものではないという局所的な生検の欠点によって苦しむことはない。本発明によって分離された細胞には、臨床作業

における病気と異常を特徴づけるために採用される、広い範囲にわたる慣用の分析手順を施すことができる。これらには、病理学および組織学的研究のための染色も含まれる。

本発明に従って得た細胞から回収したDNAは、遺伝学的ながん前あるいはがんの兆候を検出するためのPCRを基礎とした分析に供することができる。例えば、突然変異のKras、Hras及び/又はその他の突然変異を起こした遺伝子の存在や頻度についてPCR分析を行なうことができる。

本発明は次の例を参照して説明する。次に示す内容は、例として示したもので、詳細部分の変更は本発明の範囲から離れない範囲で行なうことができることが認識される。

実験

A. 糞便からの剥落上皮細胞の分離

次の手順は、糞便を処理する設備のある実験室で行なわれ、H S W A および C O S H H に従って感染、汚染、その他に対する予防措置をとった。

寸法が長さ約 20 cm、直径約 2.5 cm、表面積約 170 cm²の、重さ 100 g の典型的な便に関し、次のような手順で実施した。

A i) 便のサンプルは、便坐の下に設けられた装置によって保持されている 30 × 40 cm の透明なプラスチック製の便収集用の袋に知られた方法で直接排泄し (ビンガム他、Carcinogenesis (発がん) 13、683-690 (1992))、その袋はすぐに輪ゴムで閉じる。

A ii) 便と袋は計量する。便の重量は通常 40 から 200 g であることを確認する。

A iii) 便宜上および回収をより良好とするように、便は最低でも 50 g とし、下痢が望ましくは存在していない成形形状のものである必要がある。

A iv) 排泄後数分以内に、便が入っている袋を氷水の中に入れ、静水の圧力が袋から空気を出し、便全体が氷水に十分に接触するように袋の開いている側を氷水容器の側面にクリップで止める。冷却は少なくとも 30 分間行なう。

A v) この段階では、その他の目的のため、特に、便の表面上の細胞を観察するために顕微鏡のスライドで軽く触れることによって採取したり、また、本過程の以後の工程によって干渉される可能性のあるその他の分析用に一部を採取するため (例えば N-ニトロソ化合物とニトロソ化剤 (ビンガム他、Gastroenterology (消化器病学)、104、A389 (1993))、サンプルを採ることができる。サンプルは、ゲル化された便の硬さにより大部分の物質の曝露がその内部から最小限に抑えられるので、この段階で採ることができる。

A vi) (シグマ社より供給されている) フェノールレッド染料を含み、さらに次のような物質を含むイーグルの最少必須培地 (MEM) を含む氷温の水性懸濁溶液 pH 7.4 の 50 ml を便に加え、その袋を氷水のなかで 5 分間静かに振り動かし、便の表面が洗い落とされるようにする -

N-アセチルシステイン 50 mM

酪酸ナトリウム 3 mM

抗生物質；ペニシリン(500単位/L)、硫酸ストレプトマイシン(500 mg/L)、アムホテリシンB(1.25 mg/L)、ゲンタマイシン(50 mg/L)、炭酸水素ナトリウム 1 g/L、および熱ショックウシ血清アルブミン 10 g/L。

懸濁溶液を保存する場合は、(保存中に酸化する可能性がある)N-アセチルシステインを省略し、他は示された通りに調製してもよい。使用する日に保存した水溶液 1.0 容量に対し、50 mMのN-アセチルシステインの 0.1 容量を追加する。その結果得られた、構成要素の濃度が標準懸濁溶液よりも9%低い溶液を、標準懸濁溶液の代わりに使用することができる。

溶液はもとはフェノールレッド染料により、明るい桃色を呈しており、一般的に便の洗液は黄色がかった桃色である。振り動かす際は、便を分散させないように静かに行なう。分散した場合はすぐに色が濃くなり、洗液が茶色がかった色になるので分る。

A vi) 細胞の懸濁物を含む洗液を、袋から、大きな容器の上に支持された 125 μ mのフルイの上の 250 μ mのフルイを通して静かに注ぐ。5 gの水と細かく砕いた 20 gの硼酸を濾過した洗液に追加する。便を同じ方法でもう一度洗浄する。これらの洗液はフルイを通して静かに

注ぎ、最初の洗液と混合する。

A vii) この手順では、便 1 gに対して 1 mlの水溶液を使用しているが、便 1 gに対して少なくとも 2 mlまでを使ってさらに洗浄することによりより多くの細胞を抽出することができる。より多くの正味の容量又は回数による洗浄は、より多くの材料を生成し、正確な容量は、便の寸法と目的によって調整することができる。洗液はまだ溶けていない硼酸にもっとよく接触するように容器の中で回転させる。硼酸を沈殿させ、上澄みの洗液を静かに注ぐ。洗液は、pHを変える硼酸が部分的に溶解したことにより、色が黄色がかった桃色から黄色に代わる。

A ix) 洗液は 250 gで 10分間、0℃で、好ましくは 50 mlの透明で目盛の

付いた、底部が円錐形を形成しているプラスチック製のチューブ（例：ファルコンチューブ）に入れて遠心分離する。

Ax) 次に、ペレットの頂部の部分を失わないように上澄液を注意深く破棄する。ペレットは一般的に50 mlの洗液に対し1から2 mlで、下の部分がくらい茶色（恐らく繊維とそれに関連する細胞）で、上の部分がより明るい色を呈している。

Axi) それぞれのペレットを、5 mlの分別された水温の懸濁溶液に、大きいバステットタイプの使い捨てチューブの中でゆっくり上下に振ることにより再懸濁させ、再懸濁させたペレットを合わせて、50 mlのチューブの中の一つの中でさらに懸濁溶液を加えて希釈する（例えば

合計25 mlが都合がよい）。

Axii) 乳棒と乳鉢で細かく砕いた硼酸に冷却した懸濁溶液で1:1（重量/体積）のスラリーを作り、このスラリー10 mlを懸濁しているペレットに加える。次にチューブを静かに端から端へと5分間撹拌し、その後、濃い溶解していない硼酸を白または淡黄色のペレットとして沈殿させる。

Axiii) 3×10のBerEP-4の免疫磁気ビーズをそれからすぐに加える。これらはリン酸緩衝溶液（PBS）の中に懸濁させるなど、どのような便利な方法を使って加えてもよい。細胞、ビーズ、および不要な粒子の混合懸濁液は、チューブを垂直に保持しながら氷水の中に浸けた状態で静かに5分間撹拌する。BerEP-4の磁気ビーズは、ダイナル社から入手可能であり、あるいはハーディング他手順（Cancer Research(がんの研究)、53、3455-3458(1993))に従って、ラット抗マウスIgG1（ダイナル・プロダクトNo. 110.12から入手可能）で被覆した、M-450ダイナビーズを、BerEP4（Dakoから入手できる上皮細胞に特異的なマウス抗ヒト抗体）でインキュベートすることによって調製することができる。

Axiv) 再懸濁させたペレットとビーズの混合物を含むチューブを、ダイナルMX-1のような装置の上で、10分間その容器を回転させたり、揺り動かすことにより静かに撹拌する。細胞とビーズの複合体を磁気によって分離す

るには、ダイナル MPC-1のような磁気装置を使用する。この装置には、非常に強い磁石が垂直なチューブの側面に対して保持されており、細胞とビーズの複合体はチューブの側面に茶色の縞模様を形成する。溶解されなかった硼酸はチューブの底に落下する。

Axv) 吸引は、最初に硼酸のペレットを吸引し、次に茶色のチューブの側面に磁気で保持されている細胞とビーズの縞模様を残して、残留バクテリアと食物の廃物を含む上澄液をチューブから吸引するように、端部が細くなっている広いチューブを通して行なう。

Axvi) 磁石を取り除き、あと25 mlの懸濁溶液を使用して細胞とビーズの複合体を再懸濁させる。細胞とビーズの複合体は、2分間回転させ、揺り動かして静かに攪拌することによって洗浄し、その後、磁気による分離を反復する。上澄液は廃棄し、洗浄を繰り返すと、その廃棄した上澄液は、オリジナルの洗浄液と同じ明るい桃色を呈しているはずである。茶色は無関係な糞便の材料が洗浄中に便から除去されていることを表し、依然として細胞を汚染しているため、最終洗浄工程（工程 xvi)）を数回繰り返さなければならなくなる。

Axvii) 細胞とビーズの複合体の洗浄はさらに2回分の分別した懸濁溶液（15 ml）で繰り返し、最後の分別分は細胞とビーズの複合体を磁気で保持した後も変わらずに明るい桃色でなければならない。

Axviii) 典型的に、細胞とビーズの複合体は、再び最低量の

いずれかの適当な媒体内に再懸濁させ、エッペンドルフチューブに分別する。

B. 便の表面下からの剥落上皮細胞の分離

表面下にある哺乳類の細胞を抽出するには、上記の手順は次のように適合される。

Bi) 氷温の便は、まず、便1 gに対してそれぞれ0.5 mlの洗液4回分を使って上記の段階vi)のように全体的に洗浄する。これらの洗液は横に置いておき、典型的には10から20 gの便の一片を50 gの氷とともに大型のプラスチック製の30×40 cmのストマッカーバッグに入れる。

Bii) 上記のような、氷温の懸濁溶液を、典型的には糞便1 gに対して6 ml追

加する。

B iii) 袋をストマッカー機（例えば、コルワース・ストマッカー 3500）の中に置き、最短時間、例えば15秒消化させる。袋を取り出し、サンプルを短時間で沈殿させ、便が、ミリメートル・サイズの範囲の小さな片に壊れているが、完全に均質化して永久的に茶色の溶液／懸濁液にはなっていないことを確認する。

B iv) 袋の中の内容物をすべて上記のように容器の上に保持された125 μ mのフルイ上の250 μ mのフルイ上の500 μ mのフルイを通して静かに注ぎ、濾過する。5 gの水を加え、上記手順の段階A ix)のように懸濁液を遠心分離する。

B v) 上記手順の段階A x)からA xvii)までに従う。

C. 存在するすべてのDNAを定量分析するための剥落上皮細胞の分離手順

次の手順が、存在するすべてのDNAを定量分析するために便から剥落上皮細胞を集める際に使用された。この手順は、上記Aのセクションで述べた手順を省略し、応用した適合（特に、硼酸の処理を省いた）であり、粘液の存在が問題とならなければ、他の分析を意図した細胞の収集にも採用することができる。

C i) 上記工程A i)からA v)。

C ii) 少なくとも重さ30 gの便に対し、上記A vi) で定義した水温の懸濁溶液を、便の入っている袋の中に便1 gに対して0.5 ml加え、その袋を氷水の中で5分間静かに振り動かし、便の表面を洗浄する。重さ10 gから30 gの便に対しては、15 mlの水温の懸濁溶液を使用する。

C iii) 水性懸濁溶液を袋から静かに注ぎ出し、洗浄工程を繰り返す。

C iv) 静かに注ぎ出した洗液をひとまとめにし、250 μ mのフルイに通し、次に125 μ mのフルイに通す。

C v) 濾過液を50 mlの透明なチューブに移し、色を調べる。

—赤もしくは黄色がかった赤であり、従って比較的汚染されていない場合は、洗液は直接Ber EP-4免疫磁気ビーズ（工程A xiiiと同じく合計3 \times 10）で処理する。

—明らかに汚染されている（糞便材料の茶色が多い）場

合は、洗液を工程A ix) と同様に遠心分離し、工程A x) およびA xi) と同様にペレットを収集し、再懸濁させ、工程A xii) と同様に免疫磁気ビーズ（合計 3×10^7 ）を追加する。

C vi) 前回と同様、工程A xiv) からA xvi) に従う。

D. 糞便から分離した細胞からのDNAの抽出

工程C i) からC vi) に従って得た細胞とビーズの複合体を、 $120 \mu\text{l}$ *の細胞融解緩衝液（Tris HCl 400mM; pH 8.0; EDTA 50mM; NaCl 150mM; SDS 1%）の中に再懸濁させる。

D i) 5%のヘキサデシルトリメチルアンモニウム臭化物（CTAB、最終濃度—2%）を $80 \mu\text{l}$ 加え、よく混合する。

D ii) 70°C で10分間インキュベートする。

D iii) プロテイナーゼK（20mg/ml 溶液）を $20 \mu\text{l}$ と緩衝液AL（QIAamp 血液キット、QIAGEN）を $200 \mu\text{l}$ 加え、よく混合する。

D iv) 70°C で少なくとも30分間インキュベートする。

D v) 5000 g 以上で1分間***遠心分離する。

D vi) 上澄液を清潔なチューブ***に移す。

D vii) イソプロパノールを $210 \mu\text{l}$ を加えてよく混合する。

D viii) QIAamp スピンカラムにサンプルを入れ、5000 g 以上で1分間遠心分離する。濾過液は廃棄する。

D ix) カラムを $500 \mu\text{l}$ の緩衝液AWで洗浄し（5000

g 以上で1分間スピンさせる）、濾過液を廃棄する。

D x) 工程ix) を繰り返す。遠心分離時間—3分間

D xi) DNAを予め 70°C に熱した無菌水（ $150 \mu\text{l}$ ）で溶出し、5000 g 以上で1分間遠心分離する。

注：

*特にがん患者の場合、サンプルに剥落細胞が非常に豊富に含まれているのが通常なので、剥落細胞を効率的に再懸濁させるには、より多くの融解緩衝液を必要とする場合もある。細胞を再懸濁させたら、さらなる抽出のために懸濁液を12

0 μ l とり、サンプル中のDNAの全体量を決定する際に、体積の変更に併せて修正する。

**この工程は、糞便の粘液のPCR-阻害構成要素を除去する。さもなくばDNAと共に精製される。

***これらの工程は反復してもよい。

E. 剥落細胞からのDNA収率の分析

260 nmでUV吸収値を測定することによって、サンプル内のDNAの濃度を決定する。測定の前に、サンプルを水で1:20に希釈してもよい(例えば、DNA溶液40 μ l + 水760 μ l)。260 nmと280 nmの両方で測定すると、DNAの純度(純粋なDNA調製物では、比率260/280は1.7-1.8)を評価できる。

その後、それぞれの便のサンプルに対するDNAの総量を計算する。この値を便の重量で割ると、便1 g中にある剥落細胞DNAの量がn g単位で(便DNA指数)算出される。

予備結果は、この指数が、健康な人で600 n g/g未満、また、ポリープやがんの患者の場合は有意に高く、結腸直腸がんの場合はほとんど1500-6000の範囲であることを示している。

残ったDNAはあらゆる種類の分子の分析に使用することができる(セクションF参照)。

便のサンプルは健康な人24人(55歳未満が12人、55歳以上が12人)、結腸直腸がんの患者12人、腫瘍を外科手術で除去したがん患者10人、ポリープを有する患者9人、ポリープを除去した患者5人から採取した。ここで使用している「ポリープ」とは、形態学的には、通常は有茎である肉眼で見える特有の外観を有する腫瘍である新組織形成を意味する。顕微鏡的には、ポリープは良性の腺腫様の腫瘍として特徴づけることができる。

表 1 便の重量、便 1 サンプルあたりの DNA の量、便 DNA 指数

NO.	状態	便の重量 (g)	DNAの量/便 (ng)	便DNA指数 (ng/g)
01	がん	15	46000	3067
03	がん	15*	34745*	2443*
04	がん	8	115025	14378
06	がん	91	62770	690
07	がん	18	84375	4687
08	がん	11	60000	5455
09	がん	40	65250	1631
11	がん	191	643500	3369
12	がん	40	59400	1485
13	がん	180	763650	4242
14	がん	43	32450	755
15	がん	149	296800	1992

上記のがん患者の場合、平均の便DNA指数 \pm S. E. = 3672 ± 1057

01'	がん 手術済	44	23375	531
02'	がん 手術済	135	15400	114
03'	がん 手術済	49	45937	937
04'	がん 手術済	28	7200	257
06'	がん 手術済	96	101475	1057
07'	がん 手術済	74	25380	343
08'	がん 手術済	132	52890	401
09'	がん 手術済	35	7425	212
10'	がん 手術済	152	80437	529
11'	がん 手術済	12	3300	275

上記の手術後のがん患者の場合、平均の便DNA指数 \pm S. E. = 466 ± 98

21	ポリープ	145	77900	537
22	ポリープ	82	59400	724
24	ポリープ	67	56000	836
26	ポリープ	149	94875	637
28	ポリープ	100	426937	4269
30	ポリープ	44	109200	2482
31	ポリープ	26	53900	2073
32	ポリープ	83	38363	462
34	ポリープ	28	5100	182
36	ポリープ	76	17850	235

上記のポリープの患者の場合、平均の便DNA指数 \pm S. E. = 1244 ± 41

4

21'	ポリープ除去	111	210994	1901
22'	ポリープ除去	49	5950	121
24'	ポリープ除去	65	70400	1083
26'	ポリープ除去	34	26400	776
28'	ポリープ除去	60	40600	677

上記のポリープを除去した患者の場合、平均の便DNA指数±S. E. = 912
±292

42	55>健康な人	236	15075	64
43	55>健康な人	147	27125	185
44	55>健康な人	106*	10137.5*	97*
45	55>健康な人	49*	7170*	243*
46	55>健康な人	47*	12133*	258*
47	55>健康な人	117.7*	19932*	156*
48	55>健康な人	113.3*	20656*	212*
49	55>健康な人	192*	34453*	189*
50	55>健康な人	139.5*	21510*	146*
59	55>健康な人	132	77242	585
69	55>健康な人	214.5*	11312*	53*
70	55>健康な人	265	13750	52

上記の55歳未満の健康な人の場合、平均の便DNA指数±

S. E. = 187±42

41	55<健康な人	40	9900	247
52	55<健康な人	99	46000	465
53	55<健康な人	192	46200	241
54	55<健康な人	263	46667	177
57	55<健康な人	133	57333	431
58	55<健康な人	234	101333	433
60	55<健康な人	46	23512	511
62	55<健康な人	193	86000	446
63	55<健康な人	170	96800	569
64	55<健康な人	76	12133	160
65	55<健康な人	242	163041	674
67	55<健康な人	81	36000	444

上記の健康な人（年齢>55）の場合、平均の便DNA指数±S. E. = 400
±46

全体的には、健康な人（全年齢）の場合、平均の便DNA指数±S. E. = 30

4 ± 3 8

注：

・幾つかの便のサンプルが同じ人から入手可能であった場合は平均値を使用する。

表2. グループ間を比較したt-検定結果 (P値)

	がん 手術	ポリープ	ポリープ 除去	健康な人 <55	健康な人 >55	健康な人 (全年齢)
がん	0.0123*	0.0608	—	0.0033**	0.0053**	0.0001***
がん 手術	—	0.0837	—	0.0119*	0.5368	0.0541
ポリープ	—	—	0.6103	0.0113*	0.0379*	0.0012**
ポリープ 除去	—	—	—	0.0018**	0.0188*	0.0003***
健康な人 <55	—	—	—	0.0024**	—	—

* — P<0.05
 ** — P<0.01
 *** — P<0.001

結論

これらのデータは、結腸直腸の腫瘍（がんとポリープの両方）の患者について算出した便のDNA指数の、健康な人と比較した際の非常に有意な差を示しており、結腸直腸腫瘍のための新しい非侵的な診断試験を提供している。さらに、この指数は、がんの患者の術後のモニターの資料としても使用することができると思われる。手術後のがんの患者から測定した便のDNA指数は介入の前に比較するとずっと低くなっており、ほとんどの場合、正常な範囲内に収まっている。従って、試験は、手術の効率の制御や再発の検出などに役立つ。

F. 遺伝学的分析のために剥落細胞から抽出したDNAの適用

セクションDで説明した手順を使って剥落細胞から分離したDNAはPCR増幅に首尾よく使用されている。従来の分析手順を使った次のような分析が行なわれた。

1. 遺伝子型決定 i) 四種類の遺伝子型を区別することができる、118bpの断

片の増幅と、つづいてのRFLP（制限断片長多型分析）を含むN-アセチルトランスフェラーゼ1（NAT-1）遺伝子の遺伝子型決定。

ii) グルタチオン S-トランスフェラーゼ-タータ（GST-T）遺伝子；-GST-タータ遺伝子の78bp断片の同時増幅（GST-Tが陽性の被験者には存在し、GST-

Tが見られない人には存在しない）および制御シーケンス。NAT1とGST-Tは、両方とも、がんの危険性の増加と関連する遺伝子型の変形を有する。

2. 遺伝子の突然変異の検出 K-ras 遺伝子突然変異は非常に感受性の強いPCRを基礎とする技術を使って分析した。その方法は、糞便から抽出したDNAにおいて容易に使用することができるということが判明した。かなりのレベルの突然変異のK-rasが、がんの患者と健康な人の両方から採取したいくつかのDNAサンプルで検出された。

これらの例は、本発明で説明した技術を使って糞便のサンプルから得た剥落細胞から抽出したゲノムDNAが、実質的には、あらゆるタイプの遺伝子学的分析に使用することができることを示している。同様のアプローチがミトコンドリアのDNAにも応用できる。

G. 尿、痰または唾液、および糞便からの剥落上皮細胞の分離

尿の中の剥落細胞は選択的に次のような方法で分離させる。

i) 尿、好ましくは、その日の最初の尿を、開口部が12cm以上で、温度を5℃未満に下げるのに十分な氷を含むプラスチック製の1Lボトルまたはジョッキまたはその他の清潔な容器に収集する。

ii) 氷を溶かして尿の温度を下げるために、容器を回した後、前述のような3×10のBer-E P4免疫磁気ビーズを追加し、ビーズを懸濁した状態に維持し、ビーズが上皮細胞

と結合するように、容器を5-20分間ゆっくりと回転させる。

iii) ぴったりと密着したプラスチック製の袋で覆われた（アドバンスド・マグネティック社からの6×4の配列のSm-Co磁石のような）磁気プレートで尿

の中に挿入し、ビーズと細胞の複合体を獲得できるように1分間ゆっくりと回転させる。

iv) 尿からプレート／袋を取り出し、プレートを袋から出すと、ビーズと細胞が袋の表面に残るので、10mlずつ分別された、2回分の懸濁溶液で50mlの透明なプラスチック製のチューブの中で再懸濁させる。

v) ビーズに結合した細胞を、分別された10mlの懸濁溶液で2度洗浄し、その後の分析のために最低量だけ保存チューブに移す。

上皮細胞の収集は、上記セクションDに従ったビーズと細胞の複合体からのDNAの分離、および野生型K-rasの増幅によって確認された。

痰または唾液の中の剥落細胞は、次のような方法で選択的に分離する。

i) 唾液または痰は、びんの中に収集し、上記の懸濁溶液のような、ムコ多糖類溶解剤を含む水温の等張液で希釈する。口や歯茎の上皮表面を検査する目的で、サンプル収集の前数時間は食物を摂ることは避け、関心のある表面を削るために慣用の歯ブラシを使用する。これらには、

局所的に腫瘍の危険性を生む、噛みたばこ、たばこ、またはキンマ、あるいは、たばこ透過性バッグなどに曝露される口内の粘膜やそれに類似した領域が含まれるが、それらに限られない。

ii) 通常は、粘膜－繊毛による浄化又は咳によって口まで排出されるような呼吸器系の上皮細胞を検査するためには、好ましくは、まず、数時間何も食べないことによって口の中をきれいにし、次に水ですすいで口の上皮細胞を除去する。次にその人が痰を収集チューブの中に咳をして出す。この手順は、特に、この手順を最も必要とする人々、つまり、喫煙者や職業柄曝露される人々においては、豊富な呼吸器系からの上皮細胞が自然に存在する朝起きたときが最も実行しやすい。しかし、この手順は、このような人に限られているわけではなく、前に例示したように、腫瘍やその他の呼吸器系の病気の危険性を持つ個体は、広い範囲にわたって存在する。

iii) 唾液や痰がその粘性を低下させるために十分希釈されたことを確認したら、免疫磁気B e r - E P 4 ビーズの懸濁液をその希釈した唾液または痰に加え、

尿の時と同じように浄化を行なう。

糞便の剥落した細胞は、次のように選択的に分離する。

i) 便のサンプルを知られた方法で便坐の下装置によって保持された透明な便収集袋 $30 \times 40 \text{ cm}$ の中に直接排泄し、その袋はすぐに輪ゴムで閉める。

ii) 便と袋を計量し、便の重さが通常 40 から 200 g であ

ることを確認する。

iii) 便宜上および回収をより良好とするように、便は最低でも 50 g とし、下痢が望ましくは存在していない成形形状のものである必要がある。

iv) 排泄後数分以内に、開いた袋に入っている便を氷水の中に入れ、静水の圧力により袋から空気を出し、便全体が氷水に十分熱的に接触させる。冷却は少なくとも 30 分間行う。

v) 上記のような 4×10^7 BerEF-4 磁気ビーズを含む上記の水性懸濁溶液 50 ml を加え、袋を氷水の中に入れたまま 5 分間静かに揺り動かす。

vi) 懸濁液を、 $250 \mu\text{m}$ のフルイを通して 5 g の氷の入った容器の中に静かに注ぐ。工程(v)を反復し、合わせた洗液をMPC-1磁気装置の中に入れる。

vii) 細胞とビーズの複合体の磁気による分離は、前述の方法で行なう。懸濁液に過剰量の無関係な糞便材料が含まれている場合は、磁気分離はその懸濁液を水性懸濁溶液で希釈することにより、改善することができる。

ビーズに結合した細胞の分析は、PCR装置における 95°C またはそれに近い温度での 5 分間延長した最初の加熱でDNAを解放する予備工程を伴う、慣用の組織学的技術または慣用のPCR技術によって、容易に実行することができる。

H. 剥落細胞における酵素の活性の分析とそのなかの酵素蛋白質の検出

i) 剥落した細胞は上記セクションAまたはGに従って分離する。懸濁溶液の中の構成要素を除去するため、また酵素の活性の分析が容易に行なえるように、ビーズに結合した細胞は 15 ml の透明なチューブの中で 0°C に冷却した水溶液 10 ml の中に再懸濁させる。溶液は、(a) 50 mM の Tris-HCl pH 8、 1 mM の EDTA および 3 mM の DTT または (b) 慣用のリン酸緩衝生理食

塩水 pH 7.4 を含んでいてもよい。30 秒間静かに混合した後、細胞は上記のように磁気分離によって、または 250 g で 5 分間遠心分離することによって収集する。つづいて上澄液を取り出し、廃棄する。

ii) この洗浄工程は一度以上繰り返す。収集した細胞とビーズの複合体は三倍から十倍の体積の溶媒（エッペンドルフチューブの中に 0.3 – 1.0 ml）の中に懸濁させ、その中でそれらは壊される。

iii) a) 一つの方法として、その後の酵素の工程に適したあらゆる等張液、例えば、上記ステップ (i) の緩衝液のうちの一つの三倍の体積のものなどを使用することができ、つづいて懸濁液を氷水の中で冷却する。細胞はチタン製のホーンが取り付けられている強力な超音波処理機で温度があまり上がらないように注意しながら、チューブを氷水にずっと浸けたままで約 5 秒間の曝露で破壊される。

b) それに代わる方法として、細胞を上記セクション B に記載の様な融解緩衝液の十回分に懸濁させる。細いピ

ペットのチップを反復して通ることにより、融解水溶液と機械的な分散との組み合わせが、ビーズの一部を崩壊させうる超音波処理機の高い力なしでの細胞の破壊を提供する。[この方法は、特に、鉄などの化合物を除外したい場合などに使用すると好ましい。]

iv) 次に、上記の結果得られた細胞の断片の懸濁液をプロテアーゼインヒビターの水溶液、例えば、懸濁液 50 部に対してプロテアーゼインヒビター水溶液 1 部 [例えば、エタノールまたはジメチルスルホキシド中ポリメチルスルホニルフルオリド又はフェニルメチルスルホニルフルオリドを 8 mg/ml] を使って処理することができる。[これは、腸の上皮からの細胞のいくつかがそうであるように、細胞に実質的な量のプロテアーゼ酵素が含まれている場合は特に重要である。]

v) 次に、得られた懸濁液を、冷却した状態のままで少なくとも 5000 g で 10 分間遠心分離し、上澄液を新しいチューブに取り除く。

vi) 次に、サンプルを固形二酸化炭素または液体窒素でスナップ冷却し、分析す

るまで -80°C で保存することができる。

vii) 次に、上澄液の中の、関心のある酵素の活性と、蛋白質の濃度についての分析を実行し、結果は慣用的に1mgの蛋白質に対する活性単位で表される。これらの酵素活性には、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、キノン還元酵素(QR)、アターゼ、FaPYグリコシラ

ーゼなどの活性が含まれ、原則的に、どのような関心のある酵素でもよい。

viii) 7人の糞便から分離した剥落細胞は、総GST(CDNB基質を使用)およびQR活性についての分析のためにこの手順に供された。結果は下に示す表3に表している。

表3 人間の糞便から分離した剥落細胞における段階IIの酵素および蛋白質の分析結果

ドナー (サブノット)	蛋白質 (mg/ml)	GST (CDNB 基質) ($\mu\text{mol/分/mg}$ 蛋白質)	QR ($\mu\text{mol/分/mg}$ 蛋白質)
A(505)	6.87	0.209	0.037
A(506)	6.65	0.145	0.035
B(CxC3)	5.34	0.166	0.034
C(65CL)	5.09	0.107	0.039
D(CXH47)	0.93	0.48	0.059
D(CXH47a)*	1.55	0.69	0.034
E(CXH48)	4.9	0.20	0.018
E(CXH48a)*	2.67	0.39	0.032
F(CXH49)	3.6	0.37	0.032
F(CXH49a)*	1.6	0.41	0.053
G(CXH66)	0.37	2.7	0.26
G(CXH66a)*	0.45	2.5	0.23

*これらのサンプルは、最初のサンプルを収集した後、段階IIの酵素の活性を変えることを意図して異なった食物を摂って、1-2週間経ってから再び同じドナーから収集している。

これらの結果は、剥落した細胞は、腸の上皮細胞の代表的な段階IIの酵素の活

性をモニターするために収集し、使用することができるということを表している。これは、確立されたこれらの酵素の抗がん剤による誘発性と、DNA損傷を防ぐというこれらの役割のため、がん予防には重要である。

ix) ゲル電気泳動による上澄液の分析と、分離された蛋白質を可視化する手段、例えば、ページブルーまたはウェス

タンブロット法による染色は、たとえ活性が見出せなくても、剥落した細胞中の酵素の存在を特異的に検出する方法を提供する。これは、上皮の界面における曝露が酵素の消耗(例えばアターゼ)または阻害(例えばGST)を引き起こす結果になった時、上皮細胞にとって意義のある事である。また、この手順は、異質の蛋白質、例えば細胞分離手順で使用するBSAが除去されたかどうかの確認を提供する。

x) また、知られた方法で、上澄液からRNAを収集し、つづいて酵素に特異的なRNAを分析することは、たとえ酵素の活動又は蛋白質が見いだせなくてもその発現や誘導を検出する方法を提供する。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 96/02177

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N1/30 G01N33/574 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93 28235 A (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCHOOL) 14 October 1993 see abstract; claims	1,13-16, 18
A	SCIENCE, vol. 256, 3 April 1992, pages 102-104, XP000605488 SIDRANSKY ET AL.: "Identification of ras oncogene mutations" cited in the application see abstract	13-16, 18
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- * "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 April 1997

Date of mailing of the international search report

20-05-1997

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 1818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 631 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ceder, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 96/02177

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 52, 1992, NEW YORK NY, pages 347-350, XP000196502 ALBAUGH ET AL.: "Isolation of exfoliated colonic epithelial cells" cited in the application see abstract ---	1
Y	CANCER RESEARCH, vol. 53, 1993, pages 3455-3458, XP000605489 HARDINGHAM ET AL.: "Immunobead-PCR: A technique for the detection of circulating tumor cells" cited in the application see the whole document ---	11-18
A	---	1,10
Y	WO 92 17609 A (HOLMES MICHAEL JOHN ; DYNAL AS (NO)) 15 October 1992 see page 16 ---	11-18
Y	US 4 971 905 A (HOLMES ERIC H) 20 November 1990 see abstract -----	17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB 96/02177

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see annex

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/210

1. Claims 1-10 and
claims 12-18 (partly)

The claims disclose a method for isolating cells from faecal stool by cooling the stool and removing the cells whilst maintaining the stool at a temperature below its gel freezing point.

2. Claim 11 and
claims 12-18 (partly)

The claims disclose a method for isolating cells from a mammalian bodily waste product or alimentary tract fluid by the use of immunomagnetic beads.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 96/02177

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9320235 A	14-10-93	CA 2132874 A EP 0672181 A JP 8504081 T	14-10-93 20-09-95 07-05-96
WO 9217609 A	15-10-92	AU 1439392 A	02-11-92
US 4971905 A	20-11-90	US 5403717 A	04-04-95

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

G 0 1 N 1/28

K

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72)発明者 ロクティオノフ, アレクサードル

イギリス国ケンブリッジ・シービー4・3

キューイー, カンタベリー・ストリート・

【公報種別】・特許法第17条の2の規定による補正の掲載
【部門区分】第1部門第1区分
【発行日】平成16年9月16日(2004.9.16)

【公表番号】特表平11-511982
【公表日】平成11年10月19日(1999.10.19)
【出願番号】特願平9-510974
【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 5/06
C 1 2 Q 1/68
G 0 1 N 1/12
G 0 1 N 1/28
G 0 1 N 33/553

【F I】

C 1 2 N	5/00	E
C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	1/12	B
G 0 1 N	33/553	
G 0 1 N	1/28	J
G 0 1 N	1/28	K

【手続補正書】
【提出日】平成15年8月21日(2003.8.21)
【手続補正1】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】特許請求の範囲
【補正方法】変更
【補正の内容】

手 続 補 正 書

平成15年8月21日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示 平成9年 特許願 第510974号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 イギリス国ロンドン・ダブリュ1エヌ・4エーエル, パーク・
クレッセント・20

名 称 メディカル・リサーチ・カウンスル

住 所 イギリス国ケンブリッジシャー・シービー2・5ジェイピー,
グレイト・シェルフォード, レッド・ヒル・クロウス・5

氏 名 オニール, イアン・ケネス

3. 代 理 人

住 所 〒102-0083 東京都千代田区麴町5丁目7番地

秀和紀尾井町 TBR ビル

氏 名 (8151) 弁理士 酒 井 一

電話 03 (5210) 2681 (代表)

4. 補正対象書類名 請求の範囲

5. 補正対象項目名 請求の範囲

6. 補正の内容 別紙のとおり

方 式
審 査

佐藤

請求の範囲

1. 糞便から細胞を分離する方法であって、
 - a) 便をそのゲル氷点未満の温度に冷却する工程と、
 - b) 便が実質的に完全な状態を残すように、便をそのゲル氷点未満の温度に維持しながら便から細胞を採取する工程と、を含むことを特徴とする方法。
2. 細胞を便の表面から採取する、請求の範囲第1項に記載の方法。
3.
 - a) 便をそのゲル氷点未満の温度に冷却する工程と、
 - b) 便が実質的に完全な状態を残すように、便をそのゲル氷点未満の温度に維持しながら、水溶液で便の表面から細胞を洗い出す工程と、を含む請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。
4. 便を -10°C から 10°C までの温度に冷却する、上記請求の範囲のいずれかに記載の方法。
5. 便を 0°C から 5°C までの温度に冷却する、請求の範囲第4項記載の方法。
6. 便を短鎖脂肪酸またはその塩を含む水溶液で洗浄する、請求の範囲第3項乃至第5項のいずれか1項に記載の方法。
7. 便を酪酸ナトリウムを含む水溶液で洗浄する、請求の範囲第6項に記載の方法。
8. 削り取る、たたく、ブラシをかける、吸い取る、あるい

はその他の物理的な剥離作業によって便の表層から細胞を採取する、請求の範囲第2項に記載の方法。

9. 便の表層1.0mm未満を採取する請求の範囲第8項に記載の方法。

10. c) 予めに獲得した細胞の水性懸濁液を、細胞に選択的に結合することのできる抗体が結合している磁気ビーズを含む免疫磁気ビーズと混合する工程と、

d) 細胞が結合している磁気ビーズを磁氣的に回収する工程と、

をさらに含む前記請求の範囲のいずれかに記載の方法。

11. 抗体が、上皮細胞に結合できるBer-Ep4抗体を含む請求の範囲第10項に記載の方法。

12. 細胞が人間のものである、前記請求の範囲のいずれかに記載の方法。

13. 細胞が剥落上皮細胞を含む前記請求の範囲のいずれかに記載の方法。

14. a) 請求の範囲第1項から第13項のいずれか一項に記載の方法により、糞便から細胞を分離する工程と、

b) DNAを細胞から抽出する工程と、

を含むことを特徴とする糞便からDNAを分離する方法。

15. a) 請求の範囲第14項に記載の方法により、糞便からDNAを分離する工程と、

b) 分離されたDNAの量を決定する工程と、

c) 分離されたDNA量を、予め決定された、健康な人

及び結腸直腸の腫瘍を有する人の糞便から分離可能な
DNA量と比較する工程と、

を含む、被験者の結腸直腸の腫瘍に対する診断試験方法。

16. 請求の範囲第1項～第13項記載の方法により得られた細胞の試料の、前癌又はがん状態の診断又はモニターのための試験又はアッセイに用いるためのDNA源としての使用。

17. 請求の範囲第1項乃至第13項のいずれかに記載の方法によって剥落上皮細胞を分離する工程、及びその細胞を酵素活性について分析するか、あるいはRNAを分離し、遺伝子発現について分析する工程を含むことを特徴とする上皮細胞の酵素活性または遺伝子発現を評価する方法。

18. a) 請求の範囲第1項乃至第13項のいずれか一項に記載の方法に従って上皮細胞を分離する工程と、b) 分離した上皮細胞を生物学的または生化学的特性について分析する工程を含むことを特徴とする、非侵入的な上皮組織の生物学的または生化学的特性のモニター方法。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.